LC-MS/MS 同时测定谷物中的呕吐毒素和玉米赤霉烯酮

LCMSMS-128

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定小麦中 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的方法。样品经超声提取、SPE 净化后，液相分离、三重四极杆质谱仪内标法进行定量分析。4 种毒素在 5 ~ 150 ng/mL 浓度范围内线性良好；对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样，3 个浓度标准品的准确度和浓度的相对标准偏差分别在 95.8 ~ 112.4% 和 0.93 ~ 4.90% 之间，仪器精密度良好；同时考察了空白小麦基质加标结果，结果显示 4 种毒素 10 ng/mL 的加标回收率在 98.9 ~112.0% 之间；在某小麦样品中检出呕吐毒素 DON、ZON 和 3-ADON，浓度分别为 130.85、198.04 和 6.40 ng/mL。

关键词： 呕吐毒素 玉米赤霉烯酮 小麦 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

呕吐毒素（Vomitoxin），又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON），属单端孢霉烯族化合物，可引起猪的呕吐，故得名。当人摄入了被 DON 污染的食物后，会导致厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳、反应迟钝等急性中毒症状，严重时损害造血系统造成死亡。国际癌症研究机构将呕吐毒素被列为 3 类致癌物。欧盟食品限量要求呕吐毒素要小于 1.0 mg/kg；我国食品安全国家标准《GB2761-2011 食品中真菌毒素限量》中规定玉米等谷物及其制品中呕吐毒素限量为 1.0 mg/kg。玉米赤霉烯酮 (Zearalenone，ZON) 又称 F-2 毒素，具有雌激素样作用，能造成动物急慢性中毒，引起动物繁殖机能异常甚至死亡。我国《食品中真菌毒素限量》国家标准规定谷物及其制品限量指标为 60 mg/kg。目前为止，我国还没有使用 LC-MS/MS 检测上述毒素的国家标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用，建立了快速准确测定小麦中 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的方法，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD × 2 输液泵，DGU-20A$_5$ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：UHPLC C18 2.0 mmI.D. × 75 mmL.

流动相：A － 0.01% 氨水；

B － 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Con.
2.00	60
4.00	95
4.50	100
5.50	100
5.70	10
8.00	Stop

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，负离子扫描

离子源接口电压：–3.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：20 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表2 MRM参数

编号	英文名称（简称）	中文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	Zearalmone (ZON)	玉米赤霉烯酮	17924-92-4	317.05	131.20*	15	30	22
					175.25	15	24	17
2	Deoxynivalenol (DON)	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	51481-10-8	295.05	265.05*	20	12	26
					138.00	20	17	23
3	3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON)	3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	50722-38-8	337.05	307.20*	23	11	30
					173.20	23	11	16
4	15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON)	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	88337-96-6	337.05	150.15*	24	18	26
					219.15	24	11	22
5	^{13}C-DON（内标）	^{13}C-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	-	310.10	279.15	14	11	29
6	^{13}C-ZON（内标）	^{13}C-玉米赤霉烯酮	-	335.10	140.15	23	31	24
7	^{13}C-3-ADON（内标）	^{13}C-3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	-	354.10	323.10	17	11	20

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：

取适量单标储备液，用乙腈配制成 1000 ng/mL 的混合标准溶液，用水逐级稀释成浓度为 150、100、75、50、25、10、5 ng/mL 的标准工作液。内标物 ^{13}C–DON、^{13}C–ZON 和 ^{13}C–3–ADON 的浓度均为 50 ng/mL。

样品前处理方法：

准确称取 5.0 g 经粉碎均匀的样品至 50 mL 的离心管中，加入乙腈 / 水（84/16，v/v）40 mL，涡旋 1 min, 超声 60 min ，离心 5 min（10000 转 /min）。移取 5 mL 上清液至 MycosepTM226 多功能净化柱的玻璃管内，加入 100 µL 内标及 5 mL 乙腈溶液混匀，将多功能净化柱的填料管插入玻璃管中并缓慢推动填料管，弃去 2 mL 初滤液，取续滤液 4 mL 至氮吹瓶中。在 40 ~ 50℃下氮气吹干，用乙腈 / 水（10/90，v/v）溶液定容至 1 mL，超声涡旋 30 s，用 0.22 µm 滤膜过滤至进样瓶中备用。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC–30A 与三

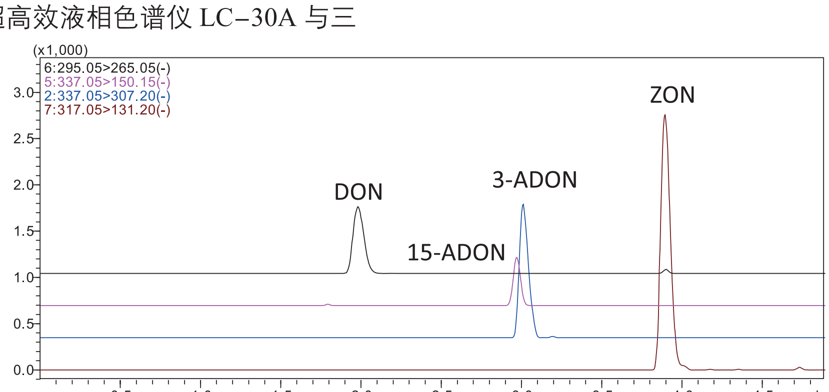

图1 10 ng/mL混合标准样品的MRM色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 5、10、25、50、75、100、150 ng/mL 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，如图 2 ~ 5 所示。4 种毒素在检测浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

表3 4种毒素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数r	检出限(ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	DON	Y = (0.0202)X + (-0.0208)	0.9994	0.31	0.94
2	15-ADON	Y = (0.0071)X + (0.0003)	0.9999	0.51	1.53
3	3-ADON	Y = (0.0229)X + (-0.0086)	0.9992	0.02	0.06
4	ZON	Y = (0.0143)X + (-0.0191)	0.9995	0.29	0.88

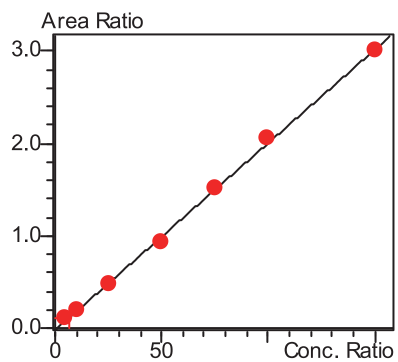

图2 DON的标准工作曲线

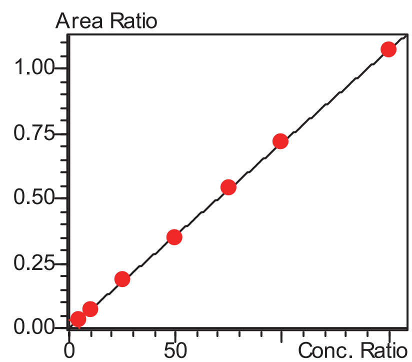

图3 15-ADON的标准工作曲线

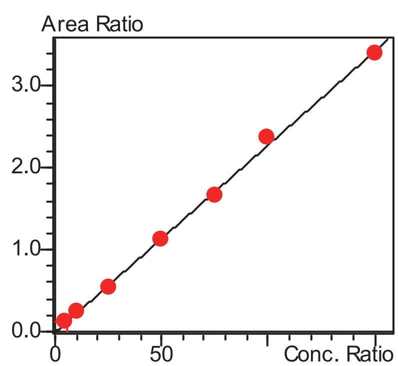

图4 3-ADON的标准工作曲线

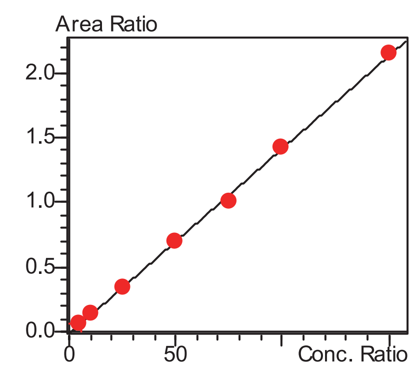

图5 ZON的标准工作曲线

2.3 精密度实验

对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样，3 个浓度标准品的准确度和浓度的相对标准偏差分别在 95.8 ~ 112.4% 和 0.93 ~ 4.90% 之间，仪器精密度良好。

表4 3个浓度标准品的准确度和浓度的相对标准偏差（n=3）

名称	5 ng/mL		10 ng/mL		100 ng/mL	
	Accuracy%	Conc. RSD%	Accuracy%	Conc. RSD%	Accuracy%	Conc. RSD%
DON	112.4	1.97	98.0	3.35	99.9	4.90
15-ADON	101.3	4.74	101.1	2.65	98.1	2.94
3-ADON	99.3	1.83	104.2	1.27	95.8	2.71
ZON	101.6	1.19	102.0	3.84	96.3	0.93

2.4 回收率考察

以空白小麦样配制加标溶液，加标浓度为 10 ng/mL，得到色谱图如图 6 所示。4 种毒素 DON 、15–ADON 、3–ADON 和 ZON 加标回收率在分别为：98.9、105.9、104.7 和 112.0%。

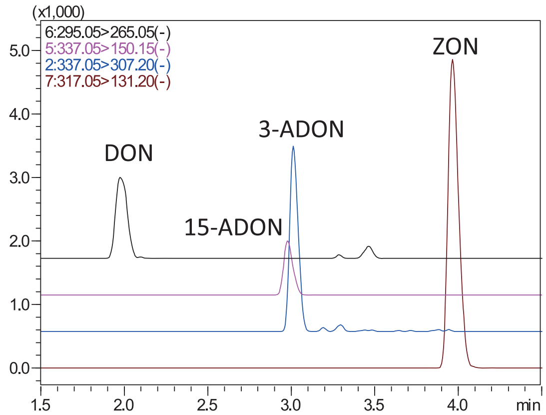

图6 基质加标10 ng/mL样品的色谱图

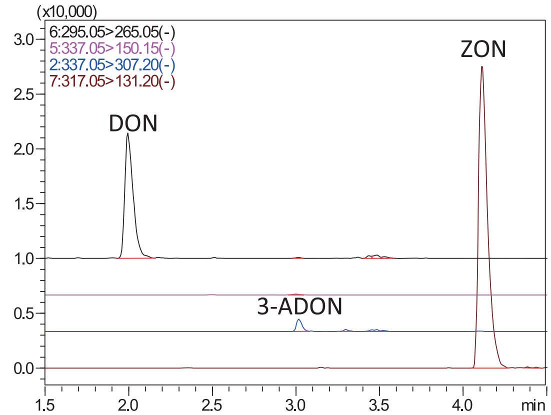

图7 小麦样品的色谱图

2.5 小麦样品分析

在某小麦样品中检出 DON、ZON 和 3–ADON，浓度分别为 130.85、198.04 和 6.40 ng/mL，色谱图见图 7。

结论

建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC–30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS–8040 联用测定小麦中 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的方法。4 种毒素在 5 ~ 150 ng/mL 浓度范围内线性良好，10 ng/mL 基质加标样品的回收率良好；低、中、高 3 个浓度标准品的准确度和浓度的相对标准偏差分别在 95.8 ~ 112.4% 和 0.93 ~ 4.90% 之间，仪器精密度良好；在某小麦样品中检出呕吐毒素 DON、ZON 和 3–ADON，浓度分别为 130.85、198.04 和 6.40 ng/mL。